

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *A. CEPHALOTES* PARA LA ISLA GORGONA EN EL CONTEXTO DEL PACÍFICO ORIENTAL TROPICAL

Alejandra López Díaz

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.

alejandra.lopez.diaz@correounivalle.edu.co

Raúl Ernesto Sedano Cruz

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.

raul.sedano@correounivalle.edu.co

RESUMEN

La variabilidad genética de *Atta cephalotes* en la Isla Gorgona y en general en el Pacífico colombiano ha sido poco estudiada, comparada con otras áreas de centro y sur América. En este estudio se caracterizó la variación genética de las hormigas cortadoras de hojas en la Isla Gorgona para ser estudiadas en el contexto del Pacífico Oriental Tropical. Se realizó la secuenciación de 414 pares de bases de la subunidad I del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa. Con un análisis de varianza molecular se describió el patrón de estructura genética para una muestra de 33 individuos que se adjuntaron a 389 secuencias reportadas en la literatura. Un análisis de asignación de individuos en poblaciones permitió identificar una agrupación de *A. cephalotes* circunscrita a la región biogeográfica Dominio del Pacífico que se delimitó geográficamente con un análisis de conectividad de la estructura genética. El origen de esta población en la isla es reciente y existe evidencia de flujo restringido de genes entre la isla y el área continental. La Isla Gorgona alberga una población genéticamente muy afín al Pacífico colombiano. La hormiga cortadora de la Isla Gorgona y el Pacífico colombiano representa una proporción importante de diversidad genética de *A. cephalotes* en América del sur y está cercanamente relacionada con las hormigas de América central.

Palabras claves: *Atta*, estructura genética, colonización, flujo genético.

ABSTRACT

The genetic variability of *Atta cephalotes* in Gorgona Island and in general in the Colombian Pacific has been poorly studied, compared to other areas of central and South America. In This study, the genetic variation of the leaf-cutting ants in the Gorgona Island was characterized to be studied in the context of the Tropical Eastern Pacific. The sequencing of 414 bases pairs of subunit I of the mitochondrial Cytochrome Oxidase gene was performed. An analysis of molecular variance described the genetic structure pattern for a sample of 33 individuals that were attached to 389 sequences reported in the literature. An assignment of individuals in populations allowed to identify a grouping of *A. cephalotes* circumscribed to the biogeographic region Domain of the Pacific that was geographically delimited with a connectivity analysis of the genetic structure. The origin of this population on the island is recent and there is evidence of restricted gene flow between the island and the continental area. Gorgona Island houses a population genetically very similar to the Colombian Pacific. The leaf-cutter ant of the Gorgona Island and the Colombian Pacific represents an important proportion of genetic diversity of *A. Cephalotes* in South America and is closely related to the ants of central America.

Key words: *Atta*, colonization, gene flow, genetic structure.

INTRODUCCIÓN

Estudiar los patrones de variación de las secuencias de ADN permite caracterizar las poblaciones naturales, es decir, diferenciar la variabilidad genética tanto al interior de una subpoblación como entre poblaciones. Disciplinas como la genética de poblaciones utiliza estos patrones de variación

genética para hacer inferencias sobre la estructura poblacional. Mediante modelos matemáticos también se han desarrollado estimadores de parámetros poblacionales como la tasa de mutación para secuencias de ADN, el tiempo de divergencia entre dos poblaciones o la tasa de migración entre poblaciones (Hey and Machado, 2003). Adicionalmente, en la actualidad los modelos estadísticos bayesianos permiten hacer representaciones espaciales de la variabilidad genética extrapolando las características del ADN a un espacio estadístico (Corander et al., 2008).

Los paisajes constituyen un marco de referencia para estudiar cómo las poblaciones pueden estar parcialmente aisladas por la distancia geográfica o por barreras que limitan la dispersión de los organismos y promueven la estructura poblacional (Avice, 2009). La estructura de una población ofrece información sobre las relaciones ancestrales de los individuos y de las poblaciones, así como sobre características del paisaje capaces de explicar el grado de diferenciación a nivel genético, morfológico o comportamental de las poblaciones. Además, conocer la distribución espacial de los organismos permite hacer predicciones a cerca del efecto de cambios ambientales sobre las poblaciones naturales, convirtiéndose en una herramienta muy útil para la conservación de la biodiversidad.

El Parque Nacional Natural Isla Gorgona es una de las dos áreas insulares del Pacífico colombiano donde predomina la selva húmeda tropical. En esta área se han documentado varias transformaciones históricas hasta que fue declarada zona protegida en 1984, hecho que incentivó la investigación científica y los esfuerzos de conservación (Giraldo et al., 2014). Gorgona presenta una alta riqueza de hormigas superando por mucho la de otras áreas insulares del Pacífico Oriental Tropical (POT). *A. cephalotes* se destaca como uno de las especies de hormigas más comunes de la isla (Valdés-Rodríguez et al., 2014) y es una especie con amplia distribución, pero endémica del

continente americano. Se distribuye desde México hasta Argentina, hasta 1700 metros sobre el nivel del mar y es uno de los herbívoros más exitoso del Neotrópico (Bacci *et al.*, 2009).

Se ha resaltado la importancia del género *Atta* como ingenieros del ecosistema ya que su actividad genera cambios en el microclima a lo largo de los transectos que recorren afectando la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas (Meyer *et al.*, 2011). Los individuos de esta especie son trabajadores recolectores que pueden provocar la defoliación de plantas en periodos cortos de tiempo ocasionando grandes pérdidas económicas en los cultivos, convirtiéndolos en una de las mayores plagas en el campo de la agricultura (Bacci *et al.*, 2009). El conocimiento sobre la sistemática del grupo, así como aspectos biológicos y ecológicos de varias especies es insuficiente (Fernández, 2003). Aunque avances en este sentido tienen como muestra, estudios sobre ecología, diversidad y riqueza de hormigas (Vázquez *et al.*, 2009; Zabala *et al.*, 2013; Arcusa, 2017), actualmente no hay información sobre el patrón de estructura genética de *A. cephalotes* en el Pacífico colombiano (Solomon *et al.*, 2008).

Este estudio tiene como objetivo realizar una caracterización del gen Citocromo Oxidasa I de *A. cephalotes* para examinar su variación en la Isla Gorgona en el marco del POT. Se examinó si la diversidad genética de *A. cephalotes* en la Isla Gorgona está más relacionada con la región occidental de la cordillera de los Andes (región *trans-andina*) que con la región oriental (región *cis-andina*), como supone la propuesta biogeográfica de Solomon y colaboradores (2008). Para esto se implementó un análisis de varianza molecular, así como un análisis bayesiano de asignación de individuos en poblaciones, y utilizando un método basado en la teoría de circuitos se estimó un mapa de conectividad genética de *A. cephalotes* en el POT. Además, mediante un análisis de la coalescencia, se examinó si la separación entre la Isla Gorgona y el margen continental del POT representa una barrera que podría haber facilitado la estructuración genética de *A. cephalotes*.

MÉTODOS

Descripción de la muestra y sitio de muestreo: la Isla Gorgona se encuentra bajo la denominación de Parque Nacional Natural y es una de las dos áreas insulares de Colombia en el Pacífico (2°9' N and 78°2' W). El parque cuenta con un área terrestre de 1382,29Ha y su altura máxima se encuentra a 338msnm (UAESPNN, 2018). La colección de individuos en este sitio se realizó entre Noviembre del año 2016 y el 2018 con el fin de tomar una muestra representativa de hormigas cortadoras de toda la isla. La recolección se realizó durante caminatas a lo largo del borde oriental de la isla como en el borde sur-occidental, al interior del bosque en el área sur entre la zona de asentamiento (al sur-occidente de la isla) y el camino hacia el cerro Trinidad.

Para evaluar la variabilidad y estructura genética de *A. cephalotes* en la Isla Gorgona y el Pacífico colombiano se utilizaron secuencias parciales de la subunidad I del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa (COI). Se construyó una base de datos con la información genética disponible en Genbank (Benson *et al.*, 2018) y muestras secuenciadas *de novo* que representan información genética para la Isla Gorgona y el Pacífico colombiano (Fig. 1). Las muestras correspondientes a las localidades de Quibdó, Guapi, Buenaventura y Dagua, fueron facilitados para que Raúl Sedano realizara la extracción de ADN, PCR, purificación de ácidos nucleicos, secuenciación y Alejandra López realizara la edición de todo el conjunto de secuencias. Raúl Sedano facilitó muestras de Isla Gorgona al ejercicio de Vanessa Muñoz Valencia (candidata al Doctorado en Ciencias Biología de la Universidad del Valle, Colombia). Este estudio está en el marco del permiso de investigación 017 de 2016 fue aprobado por la Unidad Administrativa Especial del Sistema de Parques Nacionales Naturales de Colombia.

PCR y secuenciación de ADN: la amplificación del marcador (COI) se realizó a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando un termociclador Benchmark TC9639. Las reacciones

de la PCR contenían 3,5µl de H₂O, 12,5µl de Taq DNA polimerasa (1X One Taq Hot Start Quic Maxter Mix), 2,5µl BSA, 0,5µl DMSO, 0,5µl de cada cebador, 5ng de DNA para un volumen total de 25µL. Los cebadores utilizados fueron Ben COIR (GCTACTACATAATAKGTATCATG) (Ted Schultz, comunicación personal;(Gadau et al., 2004) y Jerry COIF (CAACATTTATTTTGATTTTTTGG) (Simon *et al.*, 1994). Para la PCR se utilizó denaturación inicial a 94°C (4 min) segundo a 94°C durante 40 segundos, un paso de alineamiento a 45°C (1 min), elongación a 72°C (1.5 min) por seis ciclos desde el segundo paso. Una segunda denaturación de 94°C (1 min), 55°C (1 min) de alineación, 72°C (1.5 min) de elongación por 30 ciclos. Una extensión final de 72°C (10 min). Los productos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa de 2%. Las secuencias se obtuvieron a través de la casa comercial MACROGEN Inc.

La curación de las secuencias se llevó a cabo visualmente en el programa Sequencher versión 4.1.4 (Arbor, 2010). Se obtuvo el marco de lectura del gen para cada secuencia en la plataforma en línea ORFfinder (NCBI, 2015) Luego, las secuencias fueron sometidas al Genbank utilizando la plataforma BLAST (National Library of Medicine, 2018) para compararlas con los registros existentes, comprobar su identidad y finalmente las secuencias se depositaron en Genbank (Benson *et al.*, 2018).

Análisis estadístico: los análisis estadísticos y poblacionales se realizaron a partir de un alineamiento de 414 pb entre las secuencias registradas en la base de datos. El alineamiento de las secuencias se realizó en un servidor en línea de la red GenomeNet (Kanehisa Laboratory, 1991). La diversidad nucleotídica y la prueba de neutralidad (usando el estadístico de Tajima) por localidad se estimaron en el programa Arlequin versión 3.5.2.2 (Excoffier and Lischer, 2010). La diversidad haplotípica se estimó de categorizar secuencias parciales del gen COI por un criterio 99.999% de identidad nucleotídica entre todo el conjunto de secuencias siguiendo la metodología

descrita por Sedano y Gil (Gil and Sedano, 2019) y utilizando para esto el programa Usearch (Edgar, 2017).

Estructura poblacional: la estructura genética poblacional de *A. cephalotes* se estudió a dos escalas geográficas teniendo en cuenta la ubicación geográfica reportada para cada individuo (S3). Se realizó un análisis a escala regional que comprende América del Norte desde México hasta la costa sureste de Brasil en América del sur. Y un análisis a escala local que comprende la región del Pacífico Oriental Tropical desde México hasta Ecuador, incluyendo la Isla Gorgona.

Un análisis espacial para estudiar la estructura genética de *A. cephalotes* en América se realizó mediante una prueba de asignación de individuos. Este análisis se llevó a cabo usando el paquete Geneland V.4.0.8 del programa de R V.3.4. (Guillot *et al.*, 2005) Con este programa es posible inferir la estructura poblacional de un conjunto de datos genéticos y asignar individuos en agrupaciones utilizando información geográfica. El análisis se implementa mediante un algoritmo basado en un modelo Bayesiano y el método Monte Carlo de cadenas de Markov (Guillot *et al.*, 2005). Conociendo las coordenadas geográficas de los individuos de la muestra se tiene en cuenta la incertidumbre de la ubicación geográfica y se estima el número más probable de agrupaciones genéticas (k) en equilibrio Hardy-Weinberg (Rodríguez, 2013). Este análisis confiere a cada individuo una probabilidad de ser asignado en una agrupación sin un conocimiento *a priori* sobre las unidades poblacionales y sus límites geográficos (Guillot *et al.*, 2005).

El modelo espacial considera que la cordillera de los Andes por encima de los 1500msnm representa una barrera para la dispersión de *A. cephalotes*. El modelo asume además $k=6$ como el número máximo de poblaciones que podría parcialmente conformar la especie, una capacidad máxima de dispersión media para *A. cephalotes* equivalente a un área de 676km² considerando que la distancia de dispersión para el género *Atta* es de 2-50km (Solomon *et al.*, 2008). El análisis se

repetió independientemente diez veces y se recuperaron 25.000 datos a partir de 1.000.000 de iteraciones en cada repetición. Para elegir la repetición que mejor se ajusta al análisis implementado en Geneland V.4.0.8 (Guillot *et al.*, 2005) con el modelo espacial especificado para *A. cephalotes* en este estudio se utilizó el criterio de decisión descrito en la guía de Kass and Raftery (1995) a partir del logaritmo de los Factores de Bayes (LBF).

$$\text{LBF} = 2(\ln \text{mL}(\text{modelo 1}) - \ln \text{mL}(\text{modelo 2}))$$

Donde mL corresponde al valor de verosimilitud para cada modelo, en este caso el modelo hace referencia a la repetición del análisis. Si $\text{LBF} < -2$ entonces es preferible seleccionar el modelo 2, mientras que si $\text{LBF} > 2$ será preferible seleccionar el modelo 1 (Kass and Raftery, 1995).

Un análisis de conectividad de la estructura genética se realizó para caracterizar la delimitación geográfica de una población de *A. cephalotes* examinando la distribución de probabilidad que resulta de la asignación de individuos en Geneland V.4.0.8 (Guillot *et al.*, 2005). Este análisis complementario se fundamenta en la teoría de circuitos eléctricos y fue desarrollado en el programa Circuitscape V 4.0 (McRae, Shah and Mohapatra, 2013). En el análisis de conectividad las características del paisaje se presentan en términos de conductividad o resistencia y se implementa una serie de caminatas aleatorias entre nodos que siguen un modelo Markoviano, en este caso los nodos corresponden a los sitios de muestreo. Altos valores de conductancia indican mayor conectividad entre nodos (McRae, Shah and Mohapatra, 2013). Este análisis resulta en un mapa que proyecta el cambio de la conductividad de la variabilidad genética en términos del paisaje de probabilidad de asignación de individuos.

Tiempo de divergencia: con una aproximación a un reloj molecular estricto se estimó el tiempo de divergencia entre los haplogrupos identificados en la Isla Gorgona y aquellos que circulan en el

área continental del POT. Para esto se calculó la distancia genética patrística entre localidades utilizando el programa MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018). Esta medida de distancia genética puede ser transformada en unidades de tiempo utilizando la tasa de substitución nucleotídica.

$$\text{Tiempo de divergencia} = d \times s$$

Donde d corresponde a la diferenciación genética y s corresponde a la tasa de substitución nucleotídica para el gen COI de *A. cephalotes* de acuerdo con Solomon y colaboradores (2018).

Análisis demográfico: un análisis de coalescencia para la estimación de parámetros demográficos se implementó en el programa Migrate V 4.2.14 (Beerli, 2017). Migrate permite estimar el tamaño efectivo poblacional (θ), la tasa de migración (M) y el tiempo de divergencia (D) entre poblaciones, escalados a la tasa de mutación, mediante un método bayesiano basado en el modelo de cadenas de Markov (Beerli and Peter Beerli, 2004) considerando modelos de migración simétrica y asimétrica. Este programa utiliza información de la genealogía, considera la incertidumbre en la estimación propia de la genealogía y asume θ constante o que a lo sumo varía aleatoriamente alrededor de su valor medio, resultando más informativo que el índice de fijación F_{st} calculado con una AMOVA.

En Migrate se programó una cadena de 900.000 genealogías, se descartaron 300.000 árboles iniciales y se realizaron 20 repeticiones independientes para promediar las estimaciones de los parámetros. Para esto se utilizó un modelo de sustitución HKY y una proporción $T_i/T_v=2,0$ para estimar las frecuencias nucleotídicas de los datos. Se implementó el modo adaptativo de cadenas calientes, donde en cada paso se realizan intercambios de aceptación y rechazo en las estimaciones de los parámetros, para asegurar una búsqueda independiente y comprensiva del espacio estadístico de los parámetros. La estacionalidad de la simulación fue determinada por altos valores ESS de

cada parámetro. La integración termodinámica de la aproximación de Beziér (implementada en Migrate) fue utilizada para estimar el valor marginal de verosimilitud y calcular la probabilidad condicionada a los datos de los diferentes modelos. Con los modelos poblacionales de mayor probabilidad se reinterpretan los valores del parámetro M como una aproximación al número de inmigrantes efectivos por generación (Nm) utilizando el programa R V 3.4.4 (R Core Team, 2017) y siguiendo el manual de Migrate.

RESULTADOS

La base de datos construida para el gen COI de *A. cephalotes* contiene un total de 422 secuencias de tamaño variable (224pb -721pb) reportadas para 14 países de América. La compilación de secuencias del gen COI corresponde a 389 registros de GenBank (Benson *et al.*, 2018) y 33 registros secuenciados *de novo* para la región del Pacífico colombiano (Anexo. Tabla1) con un marco de lectura abierto de 414pb (MG948859- MG948889, MG948891, MG948895).

Se identificaron 43 haplogrupos entre los 422 registros de la base de datos. En el Pacífico Oriental Tropical se identificaron 19 haplogrupos, 17 de ellos son endémicos de esta región (Anexo. Tabla 2). Los valores estimados para el estadístico D de Tajima en cada localidad sugieren que el marcador COI satisface la condición de neutralidad (Tabla 1), y los valores negativos observados en la mayoría de las agrupaciones indican un exceso de alelos raros.

Análisis poblacional a escala regional: el análisis de asignación de individuos implementado en Geneland V.4.0.8 (Guillot *et al.*, 2005) indica $k=4$ como el número más probable de agrupaciones genéticas que conforma *A. cephalotes* en América [$LBF \leq -176,2542$]. Así, estas cuatro agrupaciones constituyen una primera aproximación a la delimitación geográfica de la estructura genética para *A. cephalotes* en América (Fig. 2). El análisis posterior implementado en Circuitscape V 4.0 (McRae, Shah and Mohapatra, 2013) permitió definir límites geográficos más precisos para

una población de *A. cephalotes* que coincide espacialmente con la región Dominio Pacífico según la caracterización de regiones biogeográficas propuesta por Morrone (2007). Esta población se distribuye en Costa Rica, Panamá, la mayor parte del occidente colombiano y parte de la zona norte del Ecuador y se denominó Dominio del Pacífico (Fig. 2b).

El hecho que los haplogrupos identificados en la población Dominio del Pacífico para *A. cephalotes* sean en su mayoría endémicos de la región *trans*-andina es consistente con los valores de alta probabilidad de asignación de los individuos en esta población (Fig. 2b). En la distribución *trans*-andina de *A. cephalotes* la diversidad genética es mayor que aquella de la región *cis*-andina (Tabla 1). Pero además se encontró evidencia fuerte de la distribución diferencial de la variación genética de *A. cephalotes* entre las regiones *trans*-andina y *cis*-andina [AMOVA $\Phi_{st57,920;1} = 0,2639370$ Prueba Exacta de Distribución Individual $P = 0,0000001$].

Análisis poblacional a escala local: en la Isla Gorgona los individuos de *A. cephalotes* son genéticamente más parecidos a los individuos de localidades cercanas en áreas continentales de Colombia y en contraste, menos parecidos a las hormigas cortadoras del área continental en el Ecuador y centro América (Tabla 2). En la diversidad de grupos haplotípicos de *A. cephalotes* en la Isla Gorgona están representados solo dos haplogrupos, H16 y H17. Estos haplogrupos son relativamente frecuentes en el Dominio del Pacífico y presentan un patrón de distribución discontinuo sin una barrera aparente en la zona continental. La distribución espacial de H16 y H17 sugiere la delimitación latitudinal ($5^{\circ}6' N$) de dos áreas en el margen continental del POT en Colombia (Fig. 4). Estas áreas corresponden a una región hacia el sur que incluye las localidades de Quibdó, Dagua, Buenaventura, Guapi y Gorgona, y termina en su punto más al sur en Ecuador. Otra región se distribuye al norte e incluye el norte de los Andes colombianos, Panamá y termina con su punto más al norte en Costa Rica (Fig. 4). Las secuencias que conforman los haplogrupos

H16 y H17 son 100% idénticas entre aquellas H16 y H17 encontradas en la isla y las regiones del área continental. Se estimó un periodo de 7846-11.900 años como el tiempo de divergencia entre los grupos haplotípicos identificados en la isla y todos los demás grupos haplotípicos identificados en la región sur y la región norte de la población del POT, respectivamente.

Los resultados del análisis de coalescencia muestran que dos de los siete modelos de migración implementados en Migrate acumulan aproximadamente un 92% de la probabilidad posterior del análisis. Ambos modelos coinciden en flujo unidireccional desde la isla hacia el continente, sin embargo, difieren sobre el origen ancestral de las poblaciones (Tabla 3). La estimación de parámetros demográficos con estos dos modelos resulta en valores modales para $\theta_{\text{continente}}$, θ_{Gorgona} y $M_{\text{Gorgona} \rightarrow \text{Continente}}$ alrededor de 0,01430, 0,00271 y 508,0, respectivamente (intervalo de confianza no presentados en la Fig. 5). El cálculo de Nm sugiere que cerca de 4 inmigrantes por generación se mueven hacia la población del Pacífico continental desde la isla (intervalo de confianza no presentados en la Fig. 5). Sólo la distribución posterior de $M_{\text{Gorgona} \rightarrow \text{Continente}}$ muestra que una parte de esta curva podría no diferenciarse de cero y por esto su interpretación debe realizarse con precaución (Fig. 5).

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio de la diversidad genética del marcador COI de *A. cephalotes* para la Isla Gorgona y su relación con el POT. El análisis de identificación de grupos haplotípicos indica que Gorgona y el Pacífico colombiano, ocupando menos del 1% del área global, acumulan aproximadamente un cuarto (23%) de la diversidad genética del gen COI de *A. cephalotes* que ha sido caracterizada en centro y sur América.

El modelo espacial de asignación de individuos de *A. cephalotes* en agrupaciones coincide sólo marginalmente con las agrupaciones genéticas propuestas por Solomon y colaboradores (2008).

Estas agrupaciones son inconsistentes con el soporte de la topología del árbol presentado (Solomon, 2007) y no son reproducibles utilizando una aproximación filogenética debido a un extenso patrón politóxico en la genealogía del marcador COI para *A. cephalotes* (datos no presentados). En contraste, este estudio estima la asignación de individuos en agrupaciones implementando un modelo espacial explícito que tiene en cuenta la capacidad de dispersión de *A. cephalotes*. Este modelo es sujeto de análisis probabilísticos altamente reproducibles y extrapolados en un contexto geográfico bien definido (Guillot et al., 2005).

La diversidad genética de *A. cephalotes* que habita las selvas del Pacífico colombiano conforma una población de hormigas cortadoras denominada aquí como Dominio del Pacífico. Esta población pudo ser acotada con un análisis de conectividad realizado en Circuitscape V 4.0 (Haase & Vinella-Brusher, 2016). Con base en los mapas aquí presentados surge la predicción que hacia los límites geográficos de la población existe un cambio en el patrón de la variación genética (Fig. 2b, Fig. 3). En estas fronteras, la región *cis-andina* colombiana probablemente conforma una agrupación genéticamente diferente con aquella identificada en Dominio del Pacífico.

Los resultados sugieren que la divergencia entre los haplogrupos de *A. cephalotes* identificados en la Isla Gorgona y aquellos identificados en el área continental del Dominio del Pacífico es reciente, posterior a la formación del istmo de Panamá (Fernández, 2003). Además, la total identidad entre los haplogrupos de la Isla Gorgona y sus pares continentales indica que desde la fijación de dichos haplogrupos en la isla el tiempo de divergencia no ha sido suficiente para acumular mutaciones que promuevan diferenciación genética entre los individuos de la isla y aquellos del área continental que portan estos haplogrupos. La diversidad genética de *A. cephalotes* en la Isla Gorgona demuestra la influencia de grupos haplotípicos que predominan en una amplia distribución latitudinal en el área continental del norte de Suramérica. Esto implica que los grupos

haplotípicos más frecuentes de la zona continental (costa sur y costa norte del Pacífico entre Costa Rica y Ecuador), ambos, han logrado colonizar la Isla Gorgona.

El hecho que los dos grupos haplotípicos identificados en la isla sean 100% idénticos con sus pares continentales y su divergencia de los otros haplogrupos de la población sea reciente sugiere: i) una introducción antropogénica de estas hormigas cortadoras no puede ser excluida como una explicación parsimoniosa para la colonización de ambos haplogrupos en la isla, ii) la acción diferencial de las fuerzas evolutivas en la isla y el continente promueven la diversificación de la especie en áreas más grandes y la extinción de haplotipos raros en áreas más pequeñas, por lo tanto, los haplogrupos identificados en Gorgona pueden representar parte de la variación genética de una población ancestral del POT que se ha mantenido en la isla.

La Isla Gorgona fue probablemente colonizada por reinas procedentes de la costa pacífica colombiana con las cuales presenta mayor identidad genética. Los grupos haplotípicos circulantes sugieren que la colonización de la isla pudo ocurrir desde latitudes al norte de la Bahía de Buenaventura, como también de poblaciones al suroccidente colombiano como la localidad de Guapi, un centro de influencia de embarcaciones hacia la isla a tan solo 60 km de distancia.

El análisis de coalescencia para estimar parámetros demográficos indica que el flujo genético entre la Isla Gorgona y el continente es restringido. Es probable que la reducida área terrestre de la isla promueva la dispersión de reinas que portan los haplogrupos más comunes del Dominio del Pacífico hacia el área continental e impida que haplogrupos poco frecuentes provenientes de la costa pacífica se establezcan en la isla.

Sabemos ahora que el Pacífico colombiano, incluyendo la Isla Gorgona, acumula una proporción importante de la diversidad genética más común de *A. cephalotes* en el contexto del Pacífico

Oriental Tropical. A la isla llega una cantidad considerable de individuos procedentes de localidades cercanas al margen continental de Colombia que han fijado recientemente los haplogrupos más comunes que circulan en el Dominio del Pacífico.

La caracterización de esta especie en el Parque Nacional Natural Isla Gorgona contribuye al conocimiento de la diversidad genética de la mirmecofauna en la isla y puede aportar como indicador para la conservación de la integridad genética del parque. Los nuevos registros de *A. cephalotes* presentados en este estudio cubren una brecha importante de información genética para la Isla Gorgona y el Pacífico colombiano. De este modo fue posible hacer una aproximación a la estructura genética y a la distribución espacial para una de las especies con más amplia distribución en el continente americano.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Diana Gil, Javier Colmenares por sus aportes y comentarios a una versión preliminar de este manuscrito. Gracias a Vanessa Muñoz Valencia por facilitar material complementario. Este estudio es una contribución para la formación de estudiantes de pregrado con CI 71077 otorgada a RS por la Universidad del Valle. El permiso de investigación 017 de 2016 fue aprobado por la Unidad Administrativa Especial del Sistema de Parques Nacionales Naturales de Colombia, y agradecemos a Luis Payan y Ximena Zorrilla por su apoyo durante la visita de investigación en la Isla Gorgona.

LITERATURA CITADA

- Arbor, A. (2010) *Sequencher V. 4.10*, Gene Codes Corporation.
- Awise, J. C. (2009) 'Phylogeography : retrospect and prospect', pp. 3–15. doi: 10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x.
- Bacci, M. *et al.* (2009) 'Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences', *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Elsevier Inc., 51(3), pp. 427–437. doi: 10.1016/j.ympev.2008.11.005.

- Beerli, P. (2017) 'Migrate'. Available at: <http://popgen.sc.fsu.edu/oldversions/4.0/>.
- Beerli, P. and Peter Beerli, P. (2004) 'Migrate Documentation', *Read*, p. 93. doi: 10.1897/04-483R.1.
- Benson, D. A. *et al.* (2018) 'GenBank', *Nucleic Acids Research*, 46(D1), pp. D41–D47. doi: 10.1093/nar/gkx1094.
- Corander, J., Siren, J. and Arjas, E. (2008) 'Bayesian spatial modeling of genetic population structure', *Computational Statistics*, 23(1), pp. 111–129. doi: 10.1007/s00180-007-0072-x.
- Edgar, R. (2017) *Drive5*. Available at: <http://drive5.com/usearch/> (Accessed: 12 October 2018).
- Excoffier, L. and Lischer, H. E. L. (2010) 'Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows', *Molecular Ecology Resources*, 10(3), pp. 564–567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- Fernández, F. (ed). (2003) *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. doi: 10.1108/EUM0000000005647.
- Gadau, J., Kronauer, D. J. C. and Hölldobler, B. (2004) 'Phylogenetics of the new world honey ants (genus *Myrmecocystus*) estimated from mitochondrial DNA sequences', *Molecular Phylogenetics and Evolution* *EVOLUTION*, 32, pp. 416–421. doi: 10.1016/j.ympev.2004.03.011.
- Gil, D. L. and Sedano, R. E. (2019) 'Genetic variation of avian malaria in the tropical Andes: a relationship with the spatial distribution of hosts', *Malaria Journal*. BioMed Central, 18(1), p. 129. doi: 10.1186/s12936-019-2699-9.
- Giraldo, A., Diazgranados, M. and Gutiérrez-Landázuri, C. (2014) 'Isla Gorgona, enclave estratégico para los esfuerzos de conservación en el Pacífico Oriental Tropical', *Revista de Biología Tropical*, 62(1–12), pp. 1–12.
- Guillot, G. *et al.* (2005) 'A spatial statistical model for landscape genetics.', *Genetics*, 170(3), pp. 1261–80. doi: 10.1534/genetics.104.033803.
- Hey, J. and Machado, C. A. (2003) 'The study of structured populations - New hope for a difficult and divided science', *Nature Reviews Genetics*, 4(7), pp. 535–543. doi: 10.1038/nrg1112.
- Kanehisa Laboratory (1991) *Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW*, Kyoto University Bioinformatics Center. Available at: <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>.
- Kass, R. E. and Raftery, A. E. (1995) 'Bayes' Factors', *Journal of the American Statistical Association*, 90(430), pp. 773–795. doi: 10.1002/9780470015902.a0005851.
- Kumar, S. *et al.* (2018) 'MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms', *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), pp. 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Manuel, J. (2017) *Monitoreo de la reserva natural Paititi mediante el uso de grupos funcionales de hormigas (Hymenóptera : Formicidae)*, Buenos Aires , Argentina ., *Monitoreo de la*

reserva natural Paititi mediante el uso de grupos funcionales de hormigas (Hymenóptera: Formicidae), Buenos Aires, Argentina.

- McRae, B. H., Shah, V. B. and Mohapatra, T. . (2013) ‘Circuitscape 4 User Guide. The Nature Conservancy’. Available at:
http://docs.circuitscape.org/circuitscape_4_0_user_guide.html?&id=gsite.
- Meyer, S. T. *et al.* (2011) ‘Ecosystem engineering by leaf-cutting ants: Nests of *Atta cephalotes* drastically alter forest structure and microclimate’, *Ecological Entomology*, 36(1), pp. 14–24. doi: 10.1111/j.1365-2311.2010.01241.x.
- National Library of Medicine (2018) *BLAST, National Center for Biotechnology Information*. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- NCBI (2015) *ORFfinder, National Center for Biotechnology Information*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> (Accessed: 12 October 2018).
- R Core Team (2017) *R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing*. doi: 10.1007/978-3-540-74686-7.
- Rodriguez, S. (2013) ‘Hardy–Weinberg Law’, in *Encyclopedia of Genetics*. Second, pp. 396–398. doi: 10.1016/B978-0-12-374984-0.00683-5.
- Simon, C. *et al.* (1994) ‘Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers’, *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6), pp. 651–701. doi: 10.1093/aesa/87.6.651.
- Solomon, S. *et al.* (2008) ‘Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity’, *PLOS ONE*, 3(7). doi: 10.1371/journal.pone.0002738.
- Solomon, S. E. (2007) *BIOGEOGRAPHY AND EVOLUTION OF WIDESPREAD LEAFCUTTING ANTS, ATTA SPP. (FORMICIDAE , ATTINI)*.
- UAESPNN (2018) *Plan de Manejo Parque Nacional Natural Gorgona 2018-2023*. Available at: <https://storage.googleapis.com/pnn-web/uploads/2018/06/PM-PNN-Gorgona-JUNIO-22.pdf>.
- Valdés-rodríguez, S., Ulloa, P. C. De and Armbrrecht, I. (2014) ‘Especies de hormigas del suelo en el Parque Nacional Natural Gorgona , Pacífico Colombiano’, 62(February), pp. 265–276.
- Vázquez Moreno, L. L. *et al.* (2009) ‘Diversidad de especies de hormigas (Hymenoptera: Formicidae) en cafetales afectados por *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)’, *Fitosanidad Habana*, 13(3), pp. 163–168. doi: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092009000300003&lng=es&nrm=iso.
- Zabala, G. A., Arango, L. M. and Chacón de Ulloa, P. (2013) ‘Diversidad de hormigas (hymenoptera: Formicidae) en un paisaje cafetero de risaralda, Colozmbia’, *Revista Colombiana de Entomologia*, 39(1), pp. 141–149.

Tabla 1. Diversidad de haplotipos del gen COI de *A. cephalotes* entre localidades de la región *trans*-andina y la región *cis*-andina como un único grupo. N: número de muestras, H: número de haplotipos, Hd: diversidad haplotípica, π : diversidad nucleotídica \pm desviación estándar, el índice D de Tajima con su valor-p de la prueba de neutralidad

Localidades	N	H	Hd	π	Tajima D	p-valor
Andes (Colombia)	7	3	0,0545	0,5238 \pm 0,2086	-1,2371	0,1179
Buenaventura	2	2	0,0363	1,0000 \pm 0,5000	0,0000	1,0000
Dagua	7	4	0,0727	0,7143 \pm 0,1809	-1,4341	0,0629
Gorgona	10	2	0,0363	0,3556 \pm 0,1591	0,0149	0,7352
Guapi	7	4	0,0727	0,8571 \pm 0,1023	-0,8764	0,2721
Quibdó	7	4	0,0727	0,7143 \pm 0,1809	-0,6540	0,3223
Costa Rica	14	4	0,0727	0,6484 \pm 0,1163	-0,2600	0,4437
Ecuador	8	3	0,0545	0,4643 \pm 0,2000	-0,4479	0,3318
Panamá	9	6	0,1090	0,8889 \pm 0,0910	-1,0690	0,1860
cis-Andes	64	23	0,4181	0,8036 \pm 0,0509	0,1428	0,6288

Tabla 2. Distancia genética para gen COI de *Atta cephalotes* entre la Isla Gorgona y áreas continentales del Pacífico Oriental Tropical.

Localidad	Φ_{st}^1
Costa Rica	0,42374*
Panamá	0,26829*
Andes (Colombia)	0,05405
Quibdó	0,17586*
Buenaventura	0,68750
Dagua	0,61827*
Guapi	0,12773
Ecuador	0,91734*

¹ Índice de fijación entre grupos Φ_{st} *=Diferencias $p < 0.05$

Tabla 3. Probabilidad de modelos poblacionales para estimar parámetros demográficos utilizando los factores de Bayes y los valores de probabilidad posterior correspondientes al método de integración termodinámica de Bezier implementado en Migrate-n V 4.214.

Modelo	Parámetros	Descripción	ln(Prob(D Model))	P(modelo)%
1	X0dX	Divergencia de la población insular desde la población continental con flujo de genes restringido	-825,424309	0,9 x 10 ⁻¹¹
2	X	Población panmíctica	-813,010018	0,60
3	XXXX	Flujo genético entre dos poblaciones en ambas direcciones	-812,394147	2,06
4	X0DX	Divergencia de la población insular a partir de la población continental con migración posterior desde el continente hacia la isla	-812,249606	2,75
5	X0XX	Flujo genético unidireccional desde la población continental hacia la población insular	-812,216319	2,94
6	XD0X	Divergencia de la población continental a partir de la población insular con migración posterior desde la isla hacia el continente	-810,850759	45,12
7	XX0X	Flujo genético unidireccional desde la población insular hacia la población continental	-810,835567	46,52

LEYENDAS DE FIGURAS

Fig. 1. Ubicación de las secuencias para el gen COI de *A. cephalotes* reportadas en la base de datos. Información geográfica para las muestras en 14 países, los nuevos registros para Colombia de cinco localidades: Quibdó, Buenaventura, Dagua, Guapi y la Isla Gorgona (triángulos) y las accesiones del Genbank (círculos).

Fig. 2. Distribución de la probabilidad de asignación de individuos desarrollada en Geneland a partir de la información genética y la ubicación geográfica registrada para las secuencias del gen COI de *A. cephalotes*. Cada uno de los mapas describe una agrupación genética y el tono naranja indica una alta probabilidad de que un individuo sea asignado a esa población mientras la misma disminuye hacia tonalidades verdes. Esta agrupación se asocia en cierta medida con la clasificación de regiones biogeográficas propuesta por Morrone (2014), dichas agrupaciones se identificaron como poblaciones pertenecientes a: **a)** Zona de transición mexicana, **b)** Dominio del Pacífico, **c)** Dominio del Chaco y Paraná, **d)** Dominio de Brasil.

Fig. 3. Conectividad de la variabilidad genética de *A. cephalotes* en el Pacífico Oriental Tropical. A mayor conectividad espacial, más oscuro es el sombreado de gris en el mapa, y viceversa. La estimación de conectividad usa la interpolación de la probabilidad de asignación de individuos del análisis en Geneland. Las accesiones del GeneBank (círculos) y las muestras *de novo* para este estudio (triángulos) (ver material suplementario S1.1).

Fig. 4. Distribución de los haplogrupos H16 (gris claro) y H17 (gris oscuro) y la frecuencia de estos haplogrupos en el área continental y en la Isla Gorgona (graficas de pastel).

Fig. 5. Histograma de la distribución posterior de probabilidad para el tamaño efectivo y la tasa de migración (escalados a la tasa de mutación) de las poblaciones de *A. cephalotes* en la Isla Gorgona y en el área continental del POT.

Figura 1

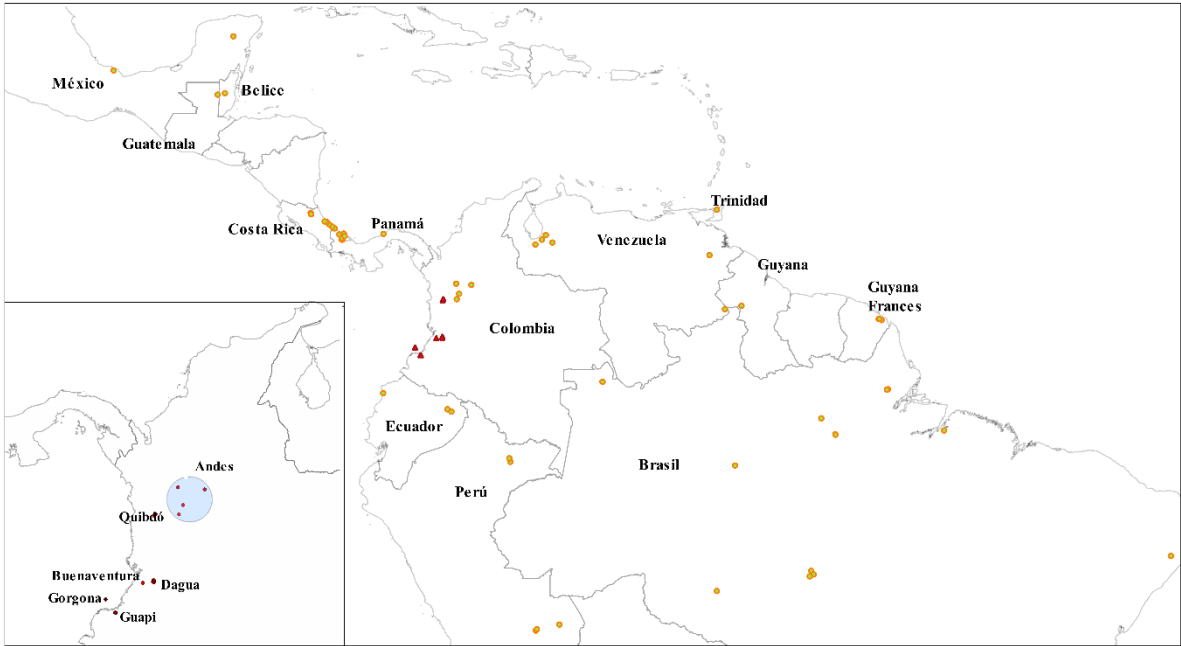


Figura 2

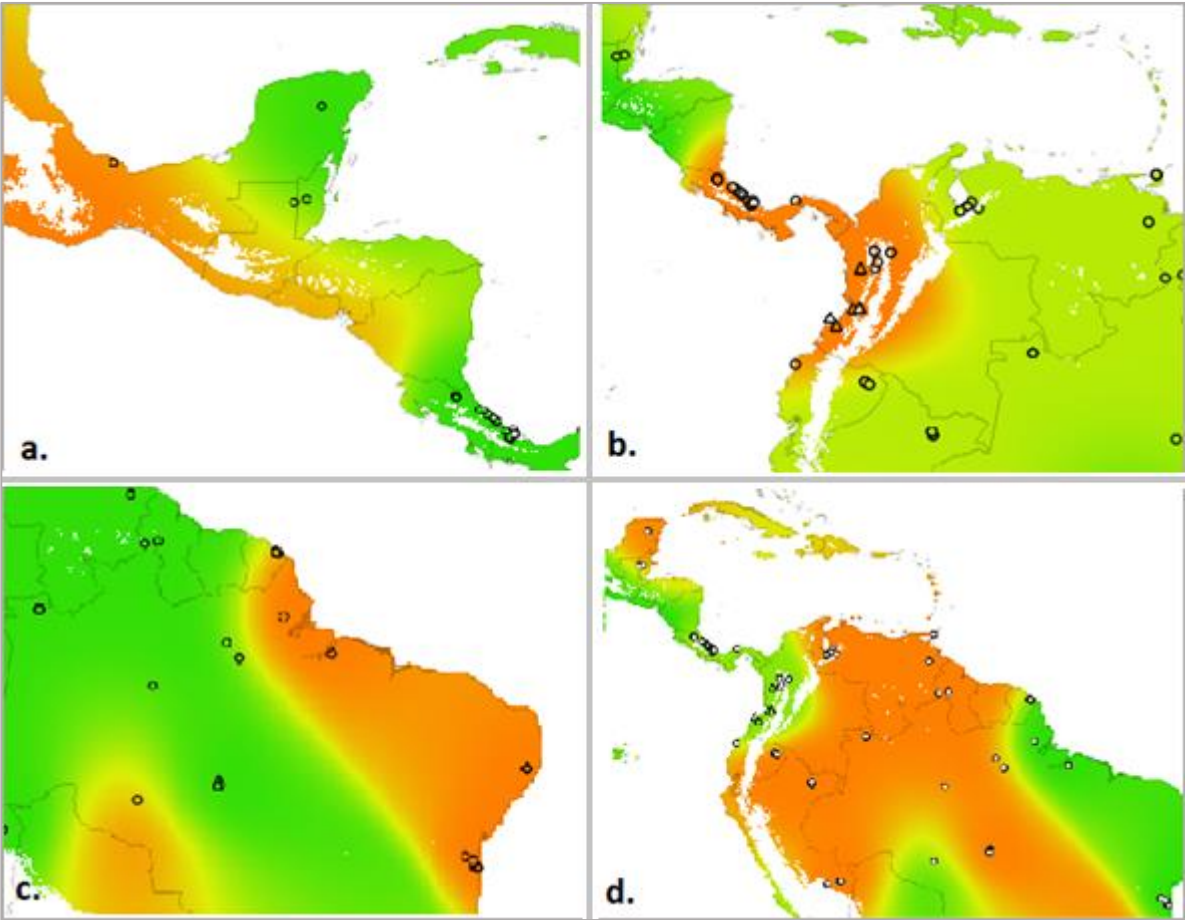


Figura 3

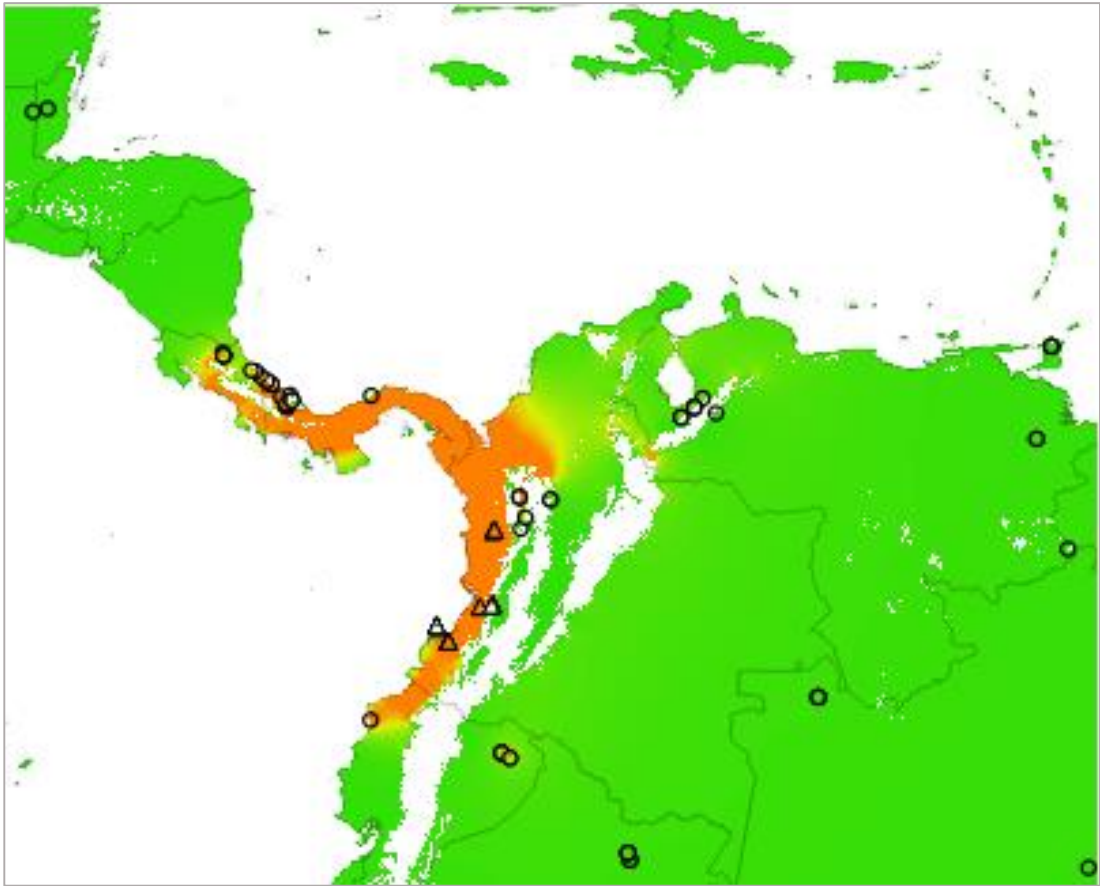


Figura 4



Figura 5.

